

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 10 septembre 2001 (10.09.01)	
Demande internationale no PCT/FR00/02753	Référence du dossier du déposant ou du mandataire 341347/18217
Date du dépôt international (jour/mois/année) 04 octobre 2000 (04.10.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 05 octobre 1999 (05.10.99)
Déposant CAUET, Gilles etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

30 avril 2001 (30.04.01)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI  
 34, chemin des Colombettes  
 1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

R. Forax

no de téléphone: (41-22) 338.83.38



# PCT

## REQUÊTE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Réservé à l'office récepteur

Demande internationale n°

Date du dépôt international

Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif)  
(12 caractères au maximum) 341347/18217

### Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION

PROCEDE DE PREPARATION DE STEROIDES MODIFIES PAR FERMENTATION DE LEVURES

### Cadre n° II DÉPOSANT

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

TRANSGENE S.A.  
11 Rue de Molsheim  
67000 STRASBOURG  
FRANCE

☐ Cette personne est aussi inventeur.

n° de téléphone

n° de télécopieur

n° de téléimprimeur

Nationalité (nom de l'État) :  
FR

Domicile (nom de l'État) :  
FR

Cette personne est  
déposant pour :

☐ tous les États  
désignés

☒ tous les États désignés sauf  
les États-Unis d'Amérique

☐ les États-Unis d'Amérique  
seulement

☐ les États indiqués dans  
le cadre supplémentaire

### Cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

CAUET Gilles  
8 Rue du Général Leclerc  
67370 GRIESHEIM SUR SOUFFEL  
FRANCE

Cette personne est :

☐ déposant seulement

☒ déposant et inventeur

☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée,  
ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'État) :  
FR

Domicile (nom de l'État) :  
FR

Cette personne est  
déposant pour :

☐ tous les États  
désignés

☐ tous les États désignés sauf  
les États-Unis d'Amérique

☒ les États-Unis d'Amérique  
seulement

☐ les États indiqués dans  
le cadre supplémentaire

☒ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

### Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRÉSENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/à été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme:

☒ mandataire

☐ représentant commun

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

MARTIN Jean-Jacques, SCHRIMPF Robert, AHNER Francis,  
WARCOIN Jacques, TEXIER Christian, LE FORESTIER Eric  
CABINET REGIMBEAU  
26 Avenue Kléber  
75116 PARIS  
FRANCE

n° de téléphone  
01 45 00 92 02

n° de télécopieur  
01 45 00 46 12

n° de téléimprimeur

☐ Adresse pour la correspondance : cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.



Suite du cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)	
<i>Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.</i>	
<p>Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</p> <p>DEGRYSE Eric 10 Allée de la Toison d'Or 94000 CRETEIL FRANCE</p>	<p>Cette personne est :</p> <p><input type="checkbox"/> déposant seulement</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> déposant et inventeur</p> <p><input type="checkbox"/> inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</p>
Nationalité (nom de l'État) : BE	Domicile (nom de l'État) : FR
<p>Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input checked="" type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire</p>	
<p>Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</p> <p>VICO Pedro Résidence le Colvert 103 Route de Schirmeck 67200 STRASBOURG FRANCE</p>	<p>Cette personne est :</p> <p><input type="checkbox"/> déposant seulement</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> déposant et inventeur</p> <p><input type="checkbox"/> inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</p>
Nationalité (nom de l'État) : FR	Domicile (nom de l'État) : FR
<p>Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input checked="" type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire</p>	
<p>Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</p> <p>LATHE Richard King's Buildings West Mains Road EDINBURGH EH9 3JQ GRANDE-BRETAGNE</p>	<p>Cette personne est :</p> <p><input type="checkbox"/> déposant seulement</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> déposant et inventeur</p> <p><input type="checkbox"/> inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</p>
Nationalité (nom de l'État) : GB	Domicile (nom de l'État) : GB
<p>Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input checked="" type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire</p>	
<p>Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</p>	<p>Cette personne est :</p> <p><input type="checkbox"/> déposant seulement</p> <p><input type="checkbox"/> déposant et inventeur</p> <p><input type="checkbox"/> inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</p>
Nationalité (nom de l'État) :	Domicile (nom de l'État) :
<p>Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire</p>	
<p><input type="checkbox"/> D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.</p>	



## Cadre n° V DÉSIGNATION D'ÉTATS

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9.a) (cocher les cases appropriées; une au moins doit l'être) :

## Brevet régional

- ☐ AP Brevet ARIPO : GH Ghana, GM Gambie, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Soudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ République-Unie de Tanzanie, UG Ouganda, ZW Zimbabwe et tout autre État qui est un État contractant du Protocole de Harare et du PCT
- ☐ EA Brevet eurasien : AM Arménie, AZ Azerbaïdjan, BY Bélarus, KG Kirghizistan, KZ Kazakhstan, MD République de Moldova, RU Fédération de Russie, TJ Tadjikistan, TM Turkménistan et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet eurasien et du PCT
- ☒ EP Brevet européen : AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, CY Chypre, DE Allemagne, DK Danemark, ES Espagne, FI Finlande, FR France, GB Royaume-Uni, GR Grèce, IE Irlande, IT Italie, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Pays-Bas, PT Portugal, SE Suède et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT
- ☐ OA Brevet OAPI : BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF République centrafricaine, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroun, GA Gabon, GN Guinée, GW Guinée-Bissau, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Sénégal, TD Tchad, TG Togo et tout autre État qui est un État membre de l'OAPI et un État contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée) :

## Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée) :

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> AE Émirats arabes unis                        | <input type="checkbox"/> LR Liberia                               |
| <input type="checkbox"/> AL Albanie                                    | <input type="checkbox"/> LS Lesotho                               |
| <input type="checkbox"/> AM Arménie                                    | <input type="checkbox"/> LT Lituanie                              |
| <input type="checkbox"/> AT Autriche                                   | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg                            |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australie                       | <input type="checkbox"/> LV Lettonie                              |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaïdjan                                | <input type="checkbox"/> MA Maroc                                 |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnie-Herzégovine                         | <input type="checkbox"/> MD République de Moldova                 |
| <input type="checkbox"/> BB Barbade                                    | <input type="checkbox"/> MG Madagascar                            |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarie                                   | <input type="checkbox"/> MK Ex-République yougoslave de Macédoine |
| <input type="checkbox"/> BR Brésil                                     |   |
| <input type="checkbox"/> BY Bélarus                                    | <input type="checkbox"/> MN Mongolie                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada                          | <input type="checkbox"/> MW Malawi                                |
| <input type="checkbox"/> CH et LI Suisse et Liechtenstein              | <input type="checkbox"/> MX Mexique                               |
| <input type="checkbox"/> CN Chine                                      | <input type="checkbox"/> NO Norvège                               |
| <input type="checkbox"/> CR Costa Rica                                 | <input type="checkbox"/> NZ Nouvelle-Zélande                      |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba                                       | <input type="checkbox"/> PL Pologne                               |
| <input type="checkbox"/> CZ République tchèque                         | <input type="checkbox"/> PT Portugal                              |
| <input type="checkbox"/> DE Allemagne                                  | <input type="checkbox"/> RO Roumanie                              |
| <input type="checkbox"/> DK Danemark                                   | <input type="checkbox"/> RU Fédération de Russie                  |
| <input type="checkbox"/> DM Dominique                                  | <input type="checkbox"/> SD Soudan                                |
| <input type="checkbox"/> EE Estonie                                    | <input type="checkbox"/> SE Suède                                 |
| <input type="checkbox"/> ES Espagne                                    | <input type="checkbox"/> SG Singapour                             |
| <input type="checkbox"/> FI Finlande                                   | <input type="checkbox"/> SI Slovénie                              |
| <input type="checkbox"/> GB Royaume-Uni                                | <input type="checkbox"/> SK Slovaquie                             |
| <input type="checkbox"/> GD Grenade                                    | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone                          |
| <input type="checkbox"/> GE Géorgie                                    | <input type="checkbox"/> TJ Tadjikistan                           |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana                                      | <input type="checkbox"/> TM Turkménistan                          |
| <input type="checkbox"/> GM Gambie                                     | <input type="checkbox"/> TR Turquie                               |
| <input type="checkbox"/> HR Croatie                                    | <input type="checkbox"/> TT Trinité-et-Tobago                     |
| <input type="checkbox"/> HU Hongrie                                    | <input type="checkbox"/> TZ République-Unie de Tanzanie           |
| <input type="checkbox"/> ID Indonésie                                  | <input type="checkbox"/> UA Ukraine                               |
| <input type="checkbox"/> IL Israël                                     | <input type="checkbox"/> UG Ouganda                               |
| <input type="checkbox"/> IN Inde                                       | <input checked="" type="checkbox"/> US États-Unis d'Amérique      |
| <input type="checkbox"/> IS Islande                                    |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japon                           | <input type="checkbox"/> UZ Ouzbékistan                           |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya                                      | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam                              |
| <input type="checkbox"/> KG Kirghizistan                               | <input type="checkbox"/> YU Yougoslavie                           |
| <input type="checkbox"/> KP République populaire démocratique de Corée | <input type="checkbox"/> ZA Afrique du Sud                        |
|  | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe                              |
| <input type="checkbox"/> KR République de Corée                        |   |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan                                 |   |
| <input type="checkbox"/> LC Sainte-Lucie                               |   |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka                                  |   |

Cases réservées pour la désignation d'États qui sont devenus parties au PCT après la publication de la présente feuille :

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> DZ Algérie            | <input type="checkbox"/> MZ Mozambique |
| <input type="checkbox"/> AG Antigua et Barbuda | <input type="checkbox"/> BZ Belize     |

Déclaration concernant les désignations de précaution : outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9.b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, à l'exception de toute désignation indiquée dans le cadre supplémentaire comme étant exclue de la portée de cette déclaration. Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (La confirmation (y compris les taxes) doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.)





Cadre n° VI REVENDECTION DE PRIORITÉ		<input type="checkbox"/> D'autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire.		
Date de dépôt de la demande antérieure (jour/mois/année)	Numéro de la demande antérieure	Lorsque la demande antérieure est une :		
		demande nationale : pays	demande régionale : * office régional	demande internationale : office récepteur
(1) 05/10/99	99 12410	FRANCE		
(2)				
(3)				

☒ L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures (seulement si la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur) indiquées ci-dessus au(x) point(s) : VI

\* Si la demande antérieure est une demande ARIPO, il est obligatoire d'indiquer dans le cadre supplémentaire ou moins un pays partie à la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle pour lequel cette demande antérieure a été déposée (règle 4.10.b(ii)). Voir le cadre supplémentaire.

Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE			
<b>Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA)</b> (si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) :	<b>Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; mention de cette recherche</b> (si une recherche antérieure a été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette dernière) :		
	Date (jour/mois/année)	Numéro	Pays (ou office régional)
ISA / EP	8 AOUT 2000	FA 585645	OEB

Cadre n° VIII BORDEREAU; LANGUE DE DÉPÔT	
La présente demande internationale contient le nombre de feuilles suivant :  requête : 4 description (sauf partie réservée au listage des séquences) : 17 revendications : 2 abrégé : 1 dessins : partie de la description réservée au listage des séquences : 2 Nombre total de feuilles : 26	Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale : 1. <input type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes 2. <input type="checkbox"/> pouvoir distinct signé <u>à suivre (2)</u> 3. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général; numéro de référence, le cas échéant : 4. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature 5. <input checked="" type="checkbox"/> document(s) de priorité indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s) : 6. <input type="checkbox"/> traduction de la demande internationale en (langue) : 7. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés 8. <input checked="" type="checkbox"/> listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés sous forme déchiffrable par ordinateur 9. <input checked="" type="checkbox"/> autres éléments (préciser) : Copie du Rapport de Recherche
Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé :	Langue de dépôt de la demande internationale : Français

Cadre n° IX SIGNATURE DU DÉPOSANT OU DU MANDATAIRE	
À côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe.  <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="flex: 1;"> <p>WARCOIN Jacques</p> </div> <div style="flex: 1; border: 2px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <b>CABINET RECHINBEAU</b>  <b>CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE</b>  <b>26, Avenue Kléber</b>  <b>75116 PARIS FRANCE</b> </div> </div>	

Réservé à l'office récepteur

1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale :	2. Dessins : <input type="checkbox"/> reçus : <input type="checkbox"/> non reçus :
3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :	
4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :	
5. Administration chargée de la recherche internationale (si plusieurs sont compétentes) : ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche.

Réservé au Bureau international

Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :
--



## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

NOTIFICATION DE LA RECEPTION DE  
L'EXEMPLAIRE ORIGINAL

(règle 24.2.a) du PCT

**ARRIVEE**  
15 NOV. 2000  
CABINET  
REGIMBEAU

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques  
Cabinet Regimbeau  
26, avenue Kléber  
F-75116 Paris  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 06 novembre 2000 (06.11.00)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 341347/18217	Demande internationale no PCT/FR00/02753

Il est notifié au déposant que le Bureau international a reçu l'exemplaire original de la demande internationale précisée ci-après.

Nom(s) du ou des déposants et de l'Etat ou des Etats pour lesquels ils sont déposants:

TRANSGENE S.A. (pour tous les Etats désignés sauf US)

CAUET, Gilles etc. (pour US seulement)

Date du dépôt international : 04 octobre 2000 (04.10.00)

Date(s) de priorité revendiquée(s) : 05 octobre 1999 (05.10.99)

Date de réception de l'exemplaire original  
par le Bureau international : 24 octobre 2000 (24.10.00)

Liste des offices désignés :

EP : AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE

National : AU,CA,JP,US

## ATTENTION

Le déposant doit soigneusement vérifier les indications figurant dans la présente notification. En cas de divergence entre ces indications et celles que contient la demande internationale, il doit aviser immédiatement le Bureau international.

En outre, l'attention du déposant est appelée sur les renseignements donnés dans l'annexe en ce qui concerne

- ☒ les délais dans lesquels doit être abordée la phase nationale
- ☒ la confirmation des désignations faites par mesure de précaution
- ☒ les exigences relatives aux documents de priorité.

Une copie de la présente notification est envoyée à l'office récepteur et à l'administration chargée de la recherche internationale.

<p>Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse</p> <p>n° de télécopieur (41-22) 740.14.35</p>	<p>Fonctionnaire autorisé</p> <p>L. Homero Hernandez</p> <p>n° de téléphone (41-22) 338.83.38</p>
--	---



**RENSEIGNEMENTS CONCERNANT LES DELAIS DANS LESQUELS DOIT ETRE ABORDEE  
LA PHASE NATIONALE**

Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale" auprès de chacun des offices désignés indiqués sur la notification de la réception de l'exemplaire original (formulaire PCT/IB/301) en payant les taxes nationales et en remettant les traductions, telles qu'elles sont prescrites par les législations nationales.

Le délai d'accomplissement de ces actes de procédure est de **20 MOIS** à compter de la date de priorité ou, pour les Etats désignés qui ont été élus par le déposant dans une demande d'examen préliminaire international ou dans une élection ultérieure, de **30 MOIS** à compter de la date de priorité, à condition que cette élection ait été effectuée avant l'expiration du 19<sup>e</sup> mois à compter de la date de priorité. Certains offices désignés (ou élus) ont fixé des délais qui expirent au-delà de 20 ou 30 mois à compter de la date de priorité. D'autres offices accordent une prolongation des délais ou un délai de grâce, dans certains cas moyennant le paiement d'une taxe supplémentaire.

En plus de ces actes de procédure, le déposant devra dans certains cas satisfaire à d'autres exigences particulières applicables dans certains offices. **Il appartient au déposant** de veiller à remplir en temps voulu les conditions requises pour l'ouverture de la phase nationale. La majorité des offices désignés n'envoient pas de rappel à l'approche de la date limite pour aborder la phase nationale.

**Des informations détaillées concernant les actes de procédure à accomplir pour aborder la phase nationale auprès de chaque office désigné, les délais applicables et la possibilité d'obtenir une prolongation des délais ou un délai de grâce et toutes autres conditions applicables figurent dans le volume II du Guide du déposant du PCT. Les exigences concernant le dépôt d'une demande d'examen préliminaire international sont exposées dans le chapitre IX du volume I du Guide du déposant du PCT.**

GR et ES sont devenues liées par le chapitre II du PCT le 7 septembre 1996 et le 6 septembre 1997, respectivement, et peuvent donc être élues dans une demande d'examen préliminaire international ou dans une élection ultérieure présentée le 7 septembre 1996 (ou à une date postérieure) ou le 6 septembre 1997 (ou à une date postérieure), respectivement, quelle que soit la date de dépôt de la demande internationale (voir le second paragraphe, ci-dessus).

Veuillez noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

**CONFIRMATION DES DESIGNATIONS FAITES PAR MESURE DE PRECAUTION**

Seules les désignations expresses faites dans la requête conformément à la règle 4.9.a) figurent dans la présente notification. Il est important de vérifier si ces désignations ont été faites correctement. Des erreurs dans les désignations peuvent être corrigées lorsque des désignations ont été faites par mesure de précaution en vertu de la règle 4.9.b). Toute désignation ainsi faite peut être confirmée conformément aux dispositions de la règle 4.9.c) avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité. En l'absence de confirmation, une désignation faite par mesure de précaution sera considérée comme retirée par le déposant. Il ne sera adressé aucun rappel ni invitation. Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration précisant l'Etat désigné concerné (avec l'indication de la forme de protection ou de traitement souhaitée) et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.

**EXIGENCES RELATIVES AUX DOCUMENTS DE PRIORITE**

Pour les déposants qui n'ont pas encore satisfait aux exigences relatives aux documents de priorité, il est rappelé ce qui suit.

Lorsque la priorité d'une demande nationale, régionale ou internationale antérieure est revendiquée, le déposant doit présenter une copie de cette demande antérieure, certifiée conforme par l'administration auprès de laquelle elle a été déposée ("document de priorité"), à l'office récepteur (qui la transmettra au Bureau international) ou directement au Bureau international, avant l'expiration d'un délai de 16 mois à compter de la date de priorité, étant entendu que tout document de priorité peut être présenté au Bureau international avant la date de publication de la demande internationale, auquel cas ce document sera réputé avoir été reçu par le Bureau international le dernier jour du délai de 16 mois (règle 17.1.a)).

Lorsque le document de priorité est délivré par l'office récepteur, le déposant peut, au lieu de présenter ce document, demander à l'office récepteur de le préparer et de le transmettre au Bureau international. La requête à cet effet doit être formulée avant l'expiration du délai de 16 mois et peut être soumise au paiement d'une taxe (règle 17.1.b)).

Si le document de priorité en question n'est pas fourni au Bureau international, ou si la demande adressée à l'office récepteur de préparer et de transmettre le document de priorité n'a pas été faite (et la taxe correspondante acquittée, le cas échéant) avant l'expiration du délai applicable mentionné aux paragraphes précédents, tout Etat désigné peut ne pas tenir compte de la revendication de priorité; toutefois, aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

Lorsque plusieurs priorités sont revendiquées, la date de priorité à prendre en considération aux fins du calcul du délai de 16 mois est la date du dépôt de la demande la plus ancienne dont la priorité est revendiquée.



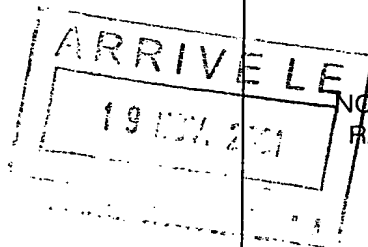
# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE  
L'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

BF/D 18217

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques  
Cabinet Regimbeau  
20, Rue de Chazelles  
75847 Paris CEDEX 17  
FRANCE



PCT

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU  
RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE  
INTERNATIONAL  
(règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition  
(jour/mois/année) 14.11.2001

Référence du dossier du déposant ou du mandataire  
341347/18217

**NOTIFICATION IMPORTANTE**

Demande internationale No.  
PCT/FR00/02753

Date du dépôt international (jour/mois/année)  
04/10/2000

Date de priorité (jour/mois/année)  
05/10/1999

Déposant  
TRANSGENE S.A. et al.

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.
2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.
3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

#### 4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international



Office européen des brevets  
D-80298 Munich  
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

DA ROCHA, O.

Tél. +49 89 2399-8101







# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE BREVETS

ARRIVE

20 AVR. 2001 PCT

CABINET  
REGIMBEAU

AVIS IMPORTANT DU DEPOSANT DE LA  
COMMUNICATION DE LA DEMANDE  
INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques  
Cabinet Regimbeau  
20, rue de Chazelles  
F-75847 Paris Cedex 17  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 12 avril 2001 (12.04.01)		
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 341347/18217		AVIS IMPORTANT
Demande internationale no PCT/FR00/02753	Date du dépôt international (jour/mois/année) 04 octobre 2000 (04.10.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 05 octobre 1999 (05.10.99)
Déposant TRANSGENE S.A. etc		

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:

AU,US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:

CA,EP,JP

La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1)a-bis)).

3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 12 avril 2001 (12.04.01) sous le numéro WO 01/25469

## RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

## RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé J. Zahra no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---

1

-----

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

**NOTIFICATION RELATIVE  
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION  
DU DOCUMENT DE PRIORITE**

(instruction administrative 411 du PCT)

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques  
Cabinet Regimbeau  
26, avenue Kléber  
F-75116 Paris  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 06 février 2001 (06.02.01)	<b>NOTIFICATION IMPORTANTE</b>
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 341347/18217	
Demande internationale no PCT/FR00/02753	
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	
Date du dépôt international (jour/mois/année) 04 octobre 2000 (04.10.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 05 octobre 1999 (05.10.99)
Déposant TRANSGENE S.A. etc	

1. La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
2. Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
3. Un **astérisque(\*)** figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
4. Les **lettres "NR"** figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

Date de prioritéDemande de priorité n°Pays, office régional ou  
office récepteur selon le PCTDate de réception du  
document de priorité

05 octo 1999 (05.10.99) 99/12410

FR

29 janv 2001 (29.01.01)

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Catherine Massetti

no de téléphone (41-22) 338.83.38



## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 341347/18217	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/02753	International filing date (day/month/year) 04 October 2000 (04.10.00)	Priority date (day/month/year) 05 October 1999 (05.10.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/53, 15/54, 9/02, 9/10, 1/19, C12P 33/06, C07J 75/00, A61K 31/56, C12P 33/06		
Applicant TRANSGENE S.A.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 30 April 2001 (30.04.01)	Date of completion of this report 14 November 2001 (14.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02753

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages \_\_\_\_\_ 1-17 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_ 1-16 \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_ 30 August 2001 (30.08.2001)
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations****1. Reference is made to the following documents:**

D1: WO 97 37664 A (ROSE KENNETH ANDREW; SECKL JONATHAN ROBERT (GB); YAU JOYCE LAI WAH) 16 October 1997 (1997-10-16)

D2: WO 99 40203 A (HOECHST MARION ROUSSEL INC) 12 August 1999 (1999-08-12) cited in the application

D3: ROSE K A ET AL: "Cyp7b, a novel brain cytochrome P450, catalyses the synthesis of neurosteroids 7.alpha.-hydroxy dehydroepiandrosterone and 7.alpha.-hydroxy pregnenolone' PROC. NAT'L. ACAD. SCI. USA, vol. 94, no. 10, 13 May 1997 (1997-05-13), pages 4925-4930, XP002163976.

2. The present invention relates a) to a method for producing hydroxylated and/or acetylated steroids involving the cultivation of yeasts that express the product of the *Cyp7b* gene on a medium including a precursor of such hydroxylated and/or acetylated steroids, b) the hydroxylated and/or acetylated steroids obtained via said method, and c) the use of said steroids to treat central nervous system disorders.

3. None of documents D1 to D3 discloses or suggest a method for producing hydroxylated and/or acetylated steroids involving cultivation of yeasts expressing the product of the *Cyp7b* gene. Only documents D1 and D3 refer to a similar method that does not include whole yeast cells, but extracts of a human cell (Hela) transformed by the *Cyp7b* gene. It follows that the subject matter of Claims 1 to 16 is novel and inventive, since a person skilled in the art would not be able to foresee in an obvious manner that a whole yeast can catalyse the same reaction as an extract from human cells (even if D1 does surmise that yeast extracts might also catalyse such a reaction). It also follows that the use of the steroids obtained via the claimed method for preparing a drug for treating central nervous system disorders is neither described nor suggested in the prior art (PCT Article 33(2) and (3)).



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/FR 00/02753

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not outline the relevant prior art set forth in documents D1-D3 and does not cite these documents.



# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>341347/18217</b>	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° <b>PCT/FR 00/ 02753</b>	Date du dépôt international (jour/mois/année) <b>04/10/2000</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) <b>05/10/1999</b>
Déposant  <b>TRANSGENE S.A. et al.</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 5 feuilles.

☒

Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

**1. Base du rapport**

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐

la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☒

contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☒

déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐

remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐

remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐

La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐

La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2.

☐

Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3.

☐

Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

☒

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐

Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

☐

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☒

le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐

suggérée par le déposant.

☐

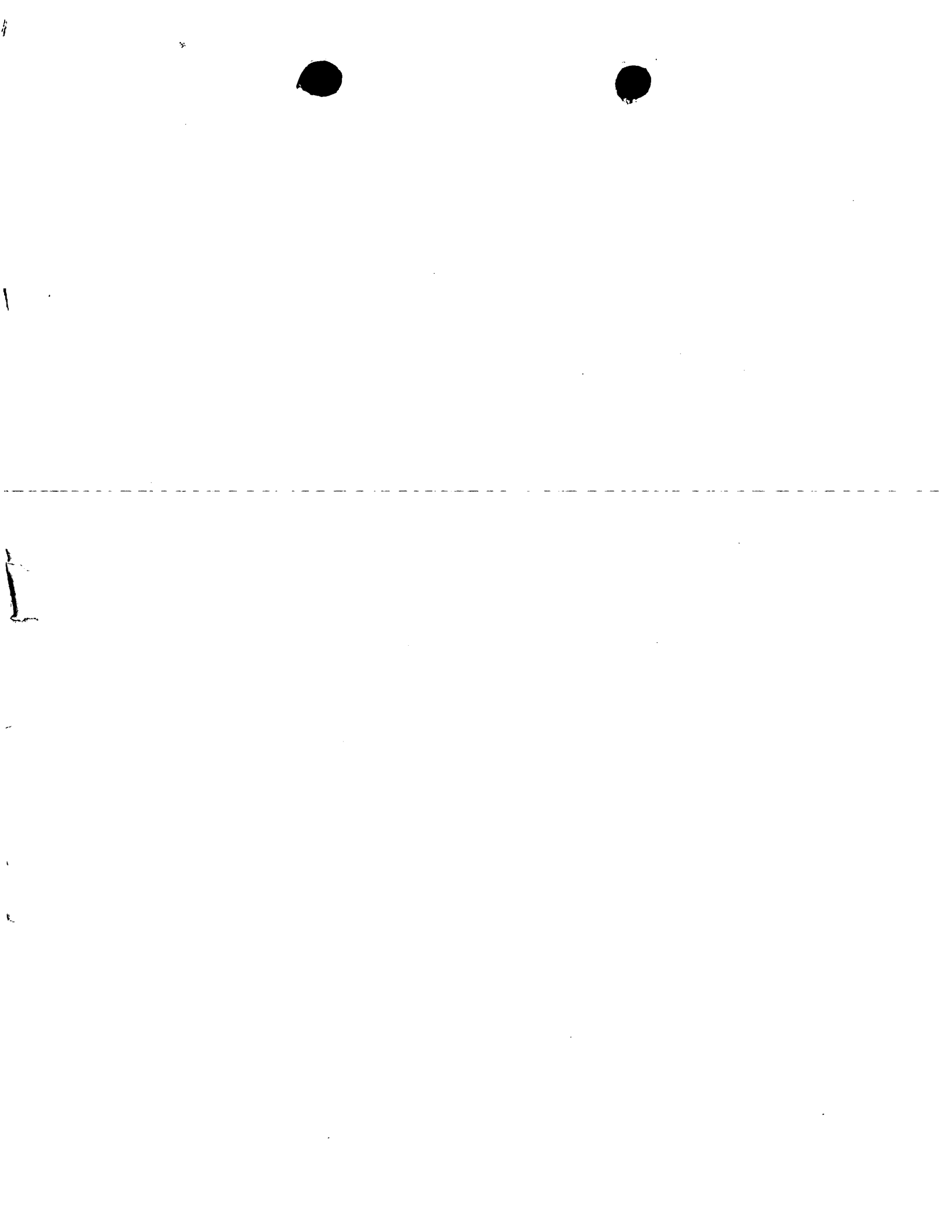
parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐

parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒

Aucune des figures n'est à publier.



## Cadr III TEXTE DE L'ABREGE (suite du point 5 de la première feuille)

La présente invention concerne un procédé de production de stéroïde hydroxylé et /ou acétylé comprenant les étapes selon lesquelles: on cultive des levures sur un milieu comprenant au moins un précurseur de tels stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés, puis on isole les stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés du milieu après bioconversion, ledit procédé étant caractérisé en ce que lesdites levures sont des levures transformées de façon à exprimer le produit du gène *Cyp7b*. L'invention concerne aussi les souches de levures modifiées.



# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or Agent's file reference 341347/18217	<b>FOR FURTHER ACTION</b>		See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/FR00/02753	International filing date (day/month/year) 04/10/2000	Priority date (day/month/year) 05/10/1999	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12P33/00			
Applicant TRANSGENE S.A. et al.			

1.	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	<p>This REPORT consists of a total of 5 sheets including this title page.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Instruction 607 of Administrative Instructions of the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of 2 sheets.</p>
3.	<p>This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priority</li> <li>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement according to Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</li> <li>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</li> <li>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</li> <li>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</li> </ul>

Date of submission of the demand 30/04/2001	Date of completion of this report 14.11.2001
Name and mailing address of the IPEA/ <div style="display: flex; align-items: center;"> <div>             European Patent Office              D-80298 Munich              Tel. +49 89 2399-0, Tlx 523656 epmu d              Fax +49 89 2399-4465           </div> </div>	Authorized officer: G. Willièr Telephone No. +49 89 2399 8548 <div style="text-align: right;"> </div>





**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn up on the basis of the following elements *(the replacement sheets received by the receiving office in response to an invitation according to Article 14 are considered in the present report as "originally filed" and are not annexed to the report as they contain no amendments (Rules 70.16 and 70.17).):*

**Description, pages:**

1-17 as originally filed

**Claims, No.:**

1-17 as originally filed

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:
- ☐ the drawings, sheets/fig:



**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/FR00/02753

5. ☐ This report has been written disregarding (some of) the amendments, which were considered as going beyond the description of the invention, as filed, as is indicated below (Rule 70.2(c)):

*(All replacement sheets comprising amendments of this nature should be indicated in point 1 and attached to this report).*

6. Additional observations, if necessary:

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

**1. Statement**

Novelty	Yes:	Claims	1-16
	No:	Claims	
Inventive Step	Yes:	Claims	1-16
	No:	Claims	
Industrial Applicability	Yes:	Claims	1-16
	No:	Claims	

**2. Citations and explanations**

**see separate sheet**

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

**see s parate sheet**



**With regard to point V**

**Reasoned statement according to Article 35(2) regarding novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Reference is made to the following document:

- D1: WO 97 37664 A (ROSE KENNETH ANDREW; SECKL JONATHAN ROBERT (GB); YAU JOYCE LAI WAH) October 16, 1997 (1997-10-16)
- D2: WO 99 40203 A (HOECHST MARION ROUSSEL INC) August 12, 1999 (1999-08-12) cited in the application
- D3: ROSE K A ET AL.: 'Cyp7b, a novel brain cytochrome P450, catalyzes the synthesis of neurosteroids 7.alpha.-hydroxy dehydroepiandrosterone and 7.alpha.-hydroxy pregnenolone' PROC. NAT'L. ACAD. SCI. USA, vol. 94, No. 10, May 13, 1997 (1997-05-13), pages 4925-4930, XP002163976

2. The present invention relates to a) a method for producing hydroxylated and/or acetylated steroids, comprising the culturing of yeasts expressing the product of the *Cyp7b* gene on a medium comprising a precursor of such hydroxylated and/or acetylated steroids, to b) the hydroxylated and/or acetylated steroids obtained using this method, and to c) the use of the steroids for treating diseases of the central nervous system.

3. None of the documents D1 to D3 either disclose or suggest a method for producing hydroxylated and/or acetylated steroids, comprising the culturing of yeasts expressing the product of the *Cyp7b* gene. Only documents D1 and D3 mention a similar method which, itself, does not comprise intact yeast cells but extracts of a human cell (Hela cell) transformed with the *Cyp7b* gene. It ensues from this that the subject matter of claims 1 to 16 is novel and involves an inventive step, since those skilled in the art could not predict in an obvious manner that an intact yeast can catalyze the same reaction as a cell extract based on human cells (even though D1 speculates that yeast extracts may also, themselves, catalyze such a reaction), and that use of the steroids obtained using the method claim d, for preparing a medicinal product for treating diseases of the central nervous system, is neither described nor suggested in the prior art (Article 33(2) and (3) PCT).



**With regard to point VII**

**Irregularities in the international application**

Contrary to that which is required by rule 5.1 a) ii) PCT, the description does not indicate the relevant prior state of the art as set out in documents D1-D3 and does not cite these documents.





Replaced  
by art. 34  
Amendment

WO 01/25469

PC/FR00/02753

22

CLAIMS

1. A method for producing hydroxylated and/or acetylated steroids, comprising the steps according to which:
- 5
- yeasts are cultured on a medium comprising at least one precursor of such hydroxylated and/or acetylated steroids, and then
  - the hydroxylated and/or acetylated steroids are isolated from the medium after bioconversion,
- 10
- said method being characterized in that said yeasts are yeasts transformed so as to express the product of the *Cyp7b* gene.
- 15
2. The method as claimed in claim 1, for producing a hydroxylated steroid, characterized in that said yeasts have low or zero APAT activity, and/or in that said yeasts are cultured under conditions which are oxidative.
- 20
3. The method as claimed in either of claims 1 and 2, characterized in that said precursor contains a 7 position which can be hydroxylated.
- 25
4. The method as claimed in one of claims 1 to 3, characterized in that said precursor is a 3-hydroxylated steroid, preferably a 3 $\beta$ -hydroxylated steroid, or a steroid which has a 3-keto function.
- 30
5. The method as claimed in claims 1 to 4, characterized in that said precursor is chosen from the steroids with a structure of the androstane, androstene, pregnane, pregnene, cholane, cholene, cholesterol, ergostane, ergostene, testosterone or
- 35



stigmastane type.

- 5 6. The method as claimed in claim 5, characterized in that the precursor is chosen from the group consisting of DHEA, testosterone, pregnenolone, pregnanolone, 25-hydroxycholesterol, 5- $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol and 5- $\alpha$ -androstene-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol.
- 10 7. The method as claimed in one of claims 2 to 6, characterized in that the APAT activity of the yeast has been rendered low or zero by inactivation of the *atf2* gene or by using an *atf2*<sup>-</sup> mutant.
- 15 8. The method as claimed in one of claims 1 to 7, characterized in that the yeast also carries dehydrogenase activity.
- 20 9. The method as claimed in claim 8, characterized in that the dehydrogenase activity is a 17-dehydrogenase which produces a 17-hydroxylated derivative.
- 25 10. The method as claimed in claim 9, characterized in that the 17-dehydrogenase activity is carried by the *yil124w* gene.
- 30 11. The method as claimed in one of claims 1 to 10, characterized in that the 17-dehydrogenase activity of the yeast has been rendered low or zero, in particular by inactivation of the *yil124w* gene or use of a *yil124w*<sup>-</sup> mutant.
- 35 12. The method as claimed in one of claims 1 to 11, characterized in that the yeast is of the genus *Saccharomyces*.
13. The method as claimed in one of claims 1 to 12, characterized in that the *Cyp7b* gene is under the



11

12

-----

control of a yeast promoter chosen from CYC1, TEF1 and TDH3.

- 5      14. A hydroxylated and/or acetylated steroid, characterized in that it can be obtained using the method as claimed in one of claims 1 to 13.
- 10      15. A yeast strain having zero 17-dehydrogenase activity by inactivation of the *yil124w* gene.
16. A yeast strain transformed with a plasmid comprising an expression cassette expressing the *Cyp7b* gene.
- 15      17. The use of a steroid as claimed in claim 14, for preparing a medicinal product for the treatment of diseases of the central nervous system.



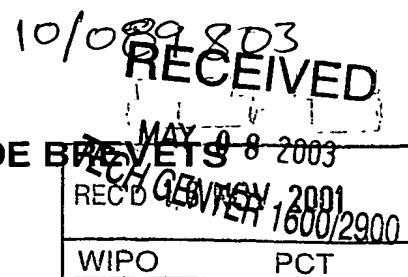
-----

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)





Référence du dossier du déposant ou du mandataire 341347/18217	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/02753	Date du dépôt international (jour/mois/année) 04/10/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 05/10/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12P33/00		
Déposant TRANSGENE S.A. et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 2 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 30/04/2001	Date d'achèvement du présent rapport 14.11.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé G. Willière N° de téléphone +49 89 2399 8548 

# RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/02753

## I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

### Description, pages:

1-17                      version initiale

### Revendications, N°:

1-16                      reçue(s) le                      03/09/2001    avec la lettre du                      30/08/2001

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description,      pages :
- ☐ des revendications,    n°s :
- ☐ des dessins,            feuilles :



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02753

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-16
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-16
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-16
	Non : Revendications

2. Citations et explications  
**voir feuille séparée**

**VII. Irrégularités dans la demande internationale**

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :  
**voir feuille séparée**

**Concernant le point V**

**Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: WO 97 37664 A (ROSE KENNETH ANDREW ;SECKL JONATHAN ROBERT (GB); YAU JOYCE LAI WAH) 16 octobre 1997 (1997-10-16)
- D2: WO 99 40203 A (HOECHST MARION ROUSSEL INC) 12 août 1999 (1999-08-12) cité dans la demande
- D3: ROSE K A ET AL.: 'Cyp7b; a novel brain cytochrome P450; catalyzes the synthesis of neurosteroids 7.alpha.-hydroxy dehydroepiandrosterone and 7.alpha.-hydroxy pregnenolone' PROC. NAT'L. ACAD. SCI. USA, vol. 94, no. 10, 13 mai 1997 (1997-05-13), pages 4925-4930, XP002163976

2. La présente invention concerne a) un procédé de production de stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés comprenant la cultivation de levures exprimant le produit du gène *Cyp7b* sur un milieu comprenant un précurseur de tels stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés, b) les stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés obtenu par ce procédé, et c) l'utilisation des stéroïdes pour le traitement de maladies du système nerveux centrale.

3. Aucun des documents D1 à D3 ne divulgue ni suggère un procédé de production de stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés comprenant la cultivation de levures exprimant le produit du gène *Cyp7b*. Seul les documents D1 et D3 mentionnent un procédé similaire qui lui ne comprend pas de cellules de levure intact, mais des extrait d'un cellule humaine (Hela) transformée par le gène *Cyp7b*. Il en suit que l'objet des revendications 1 à 16 est nouveau et implique une activité inventive, comme l'homme de l'art ne pouvait pas prévoir de façon évidente qu'une levure intacte peut catalyser la même réaction qu'un extrait cellulaire à base de cellules humaines (même si D1 spécule que des extraits de levures pourrait catalyser eux aussi un réaction pareil) et q'une utilisation des stéroïdes obtenu par le procédé revendiqué pour la préparation d'un médicament pour le traitement de maladies du système nerveux central n'est ni décrit ni suggéré dans

l'art antérieur (article 33(2) et (3) PCT).

**Concernant le point VII****Irrégularités dans la demande internationale**

Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans les documents D1-D3 et ne cite pas ces documents.

### REVENDICATIONS

1) Procédé de production de stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés comprenant les étapes selon lesquelles :

5

- on cultive des levures sur un milieu comprenant au moins un précurseur de tels stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés, puis
- on isole les stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés du milieu après bioconversion,

ledit procédé étant caractérisé en ce que lesdites levures sont des levures transformées de façon à exprimer le produit du gène *Cyp7b*.

10

2) Procédé selon la revendication 1 de production de stéroïde hydroxylé, caractérisé en ce que lesdites levures ont une activité APAT faible ou nulle et/ou en ce que l'on cultive lesdites levures dans des conditions oxydatives.

3) Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le dit précurseur contient une position 7 susceptible d'être hydroxylée.

15

4) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le dit précurseur est un stéroïde 3-hydroxylé, de préférence 3 $\beta$ -hydroxylé, ou possédant une fonction 3-céto.

20

5) Procédé selon la revendication 1 à 4, caractérisé en ce que le dit précurseur est choisi parmi les stéroïdes à structure de type androstanique, androsténique, prégnanique, prégnénique, cholanique, cholénique, cholestérique, ergostanique, ergosténique, testostéronique ou stigmamique.

25

6) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le précurseur est choisi parmi le groupe consistant en la DHEA, la testostérone, la pregnénolone, la prégnanolone, le 25-hydroxy-cholestérol, le 5- $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ -17 $\beta$ -diol, et le 5- $\alpha$ -androstène-3 $\beta$ -17 $\beta$ -diol.

7) Procédé selon l'une des revendications 2 à 6, caractérisé en ce que l'activité APAT de la levure a été rendue faible ou nulle par inactivation du gène *atf2* ou par utilisation d'un mutant *atf2*.

30

8) Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la levure porte également une activité déshydrogénase.

9) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'activité déshydrogénase est une 17-déshydrogénase qui conduit à un dérivé 17-hydroxylé.

10) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'activité 17-déshydrogénase est portée par le gène *yil124w*.

5 11) Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'activité 17-déshydrogénase de la levure a été rendue faible ou nulle, en particulier par inactivation du gène *yil124w* ou utilisation d'un mutant *yil124w*.

12) Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la levure est du genre *Saccharomyces*.

10 13) Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le gène *Cyp7b* est sous le contrôle d'un promoteur levure choisi parmi CYC1, TEF1 et TDH3.

14) Souche de levure possédant une activité 17-déshydrogénase nulle par inactivation du gène *yil124w*.

15 15) Souche de levure transformée avec un plasmide comprenant une cassette d'expression exprimant le gène *Cyp7b*.

16) Utilisation d'un stéroïde obtenu par le procédé selon l'une des revendications 1 à 13, pour la préparation d'un médicament pour le traitement de maladies du système nerveux central.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
12 avril 2001 (12.04.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 01/25469 A2

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>: C12P 33/00

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/02753

(22) Date de dépôt international: 4 octobre 2000 (04.10.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:  
99/12410 5 octobre 1999 (05.10.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): TRANS-  
GENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Stras-  
bourg (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): CAUET,  
Gilles [FR/FR]; 8, rue du Général Leclerc, F-67370  
Griesheim sur Souffel (FR). DEGRYSE, Eric [BE/FR];  
10, allée de la Toison d'Or, F-94000 Créteil (FR). VICO,

Pedro [FR/FR]; Résidence le Colvert, 103, route de  
Schirmeck, F-67200 Strasbourg (FR). LATHE, Richard  
[GB/GB]; King's Buildings, West Mains Road, Edinburgh  
EH9 3JQ (GB).

(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet  
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17  
(FR).

(81) États désignés (national): AU, CA, JP, US.

(84) États désignés (régional): brevet européen (AT, BE, CH,  
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE).

Publiée:

— Sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR PREPARING STEROIDS MODIFIED BY YEAST FERMENTATION

(54) Titre: PROCEDE DE PREPARATION DE STEROIDES MODIFIES PAR FERMENTATION DE LEVURES

(57) Abstract: The invention concerns a novel method for producing hydroxylated and/or acetylated steroid comprising steps which consist in: culturing yeasts on a medium comprising at least a precursor of such hydroxylated and/or acetylated steroids; then isolating the hydroxylated and/or acetylated steroids from the medium after bioconversion. Said method is characterised in that said yeasts are yeasts transformed so as to express the product of *Cyp7b* gene. The invention also concerns the modified yeast strains.

(57) Abrégé: La présente invention concerne un nouveau procédé de production de stéroïde hydroxylé et/ou acétylé comprenant les étapes selon lesquelles: on cultive des levures sur un milieu comprenant au moins un précurseur de tels stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés, puis on isole les stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés du milieu après bioconversion, ledit procédé étant caractérisé en ce que lesdites levures sont des levures transformées de façon à exprimer le produit du gène *Cyp7b*. L'invention concerne aussi les souches de levures modifiées.

WO 01/25469 A2



-----



## PROCEDE DE PREPARATION DE STEROIDES MODIFIES PAR FERMENTATION DE LEVURES

La présente invention concerne un nouveau procédé de production de stéroïdes hydroxylés ou/et acétylés par fermentation de levures.

5 Les stéroïdes, notamment les stéroïdes dérivés du cholestérol, sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques parmi lesquels on peut citer la régulation des taux de glucides et cholestérol dans la circulation sanguine, le maintien et développement de la masse musculaire, le développement du système nerveux central.

Parmi les inconvénients observés en cas de dérèglement des taux de stéroïdes  
10 circulants, on peut citer le déclenchement éventuel de maladies auto-immunes, telles le lupus, de certains cancers, par exemple le cancer du sein, de maladies cardiovasculaires, par exemple l'athérosclérose. Des problèmes de régulation de stéroïdes sont également soupçonnés dans le cas du déclenchement de certaines maladies neurologiques tels les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer.

15 Les études réalisées, notamment par le Professeur Baulieu, sur la déhydroépiandrostérone ou DHEA ont montré l'importance des stéroïdes, notamment des neurostéroïdes, dans le développement du système nerveux central mais également l'impact possible de ce type de stéroïdes dans tous les processus connexes, y compris le phénomène de vieillissement (Baulieu et Robel, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci., 95,  
20 4089-4091).

Il est donc particulièrement intéressant de pouvoir disposer de nouveaux dérivés stéroïdiques, notamment de la famille des neurostéroïdes, qui sont impliqués dans un très grand nombre de processus physiologiques.

C'est précisément l'un des objets de la présente invention, à savoir la mise au  
25 point d'un procédé permettant l'accès à de nouveaux dérivés stéroïdiques, notamment des neurostéroïdes, et ce par des méthodes de fermentation qui autorisent des spécificités élevées, de même que des rendements de production importants.

Les procédés selon la présente invention peuvent d'ailleurs être utilisés afin d'obtenir des stéroïdes dont la structure est également connue mais qui, jusqu'ici,  
30 étaient difficilement accessibles par des procédés commercialement acceptables.

La présente invention repose sur la mise en évidence du fait que les levures sont capables de convertir biologiquement, ou bioconvertir, des stéroïdes précurseurs en produisant des stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés divers, lesquels peuvent bien

100

100

100

100

100

100

entendu, si cela est nécessaire, être ensuite modifiés sur de telles fonctions particulièrement réactives.

C'est pourquoi la présente invention concerne notamment un procédé de production de stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés comprenant les étapes selon  
5 lesquelles :

- on cultive des levures sur un milieu comprenant au moins un précurseur de tels stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés, puis
- on isole les stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés du milieu après bioconversion,

10 ledit procédé étant caractérisé en ce que lesdites levures sont des levures transformées de façon à exprimer le produit du gène *Cyp7b*.

La levure possède naturellement une activité enzymatique d'acétylation codée par le gène *atf2*, et une activité enzymatique de déshydrogénation codée par le gène *yil124w*.

15 L'enzyme codée par le gène *atf2* (dont la séquence et l'activité sont décrites dans Cauet et al., 1999, Eur. J. Biochem., 261, 317-324 et dans la demande de brevet français FR2774393 ou à l'adresse <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>) est l'acétyl coenzyme-A-pregnénolone-acétyl transférase, ci-après dénommée « APAT ». Cette enzyme permet l'estérification, et plus particulièrement l'acétylation,  
20 d'un précurseur stéroïdien tel que par exemple un  $\Delta^5$  - ou  $\Delta^4$  - $3\beta$ -hydroxystéroïde, tel que la pregnénolone, la 17-hydroxy pregnénolone, la déhydroépiandrostérone (DHEA), ou la 4-pregnene- $3\beta$ ol-20-one, par exemple. De manière préférée, cette estérification est réalisée au niveau de la fonction OH en position 3 d'undit précurseur. L'expression de cette activité dans les levures permet par conséquent l'obtention de  
25 dérivés de précurseurs stéroïdiens acétylés, en tout ou en partie. De même il est possible de protéger chimiquement tout ou partie des fonctions OH du précurseur incorporé au milieu de culture de manière à ce que la réaction d'acétylation ne puisse pas se produire sur tout ou partie desdites fonctions. De telles méthodes de protection sont bien connues et consistent par exemple en l'addition de silane, en la modification  
30 en fonction ester,...

Toutefois, selon un mode de réalisation particulier de la présente invention décrit ci-après, il est également possible d'utiliser des souches de levure dépourvue de l'activité enzymatique APAT, telles que notamment celles décrites dans Cauet et al.



(1999, Eur. J. Biochem., 261, 317-324) ou dans la demande de brevet français FR2774393, dont les contenus sont incorporés par référence dans la présente demande.

Le gène *yil124w* a été décrit lors du projet de séquençage du génome de la levure, toutefois sa fonction n'avait alors pas été déterminée. Il est localisé sur le chromosome IX, aux coordonnées 126204 à 127097. Sa séquence est aisément accessible à l'homme de l'art dans la base de données du génome de *Saccharomyces* située, par exemple, à l'adresse <http://genome-www.stanford.edu/>. Dans le cadre des travaux de la présente invention, il a été montré que la protéine codée par le gène *yil124w* possède une activité déshydrogénase comparable à l'activité de la 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase précédemment décrite chez les mammifères (17BDH ; Wu et al., 1993, J. Biol. Chem., 268, 12964-12969). Cette activité dirige plus spécifiquement la réduction en alcool de la fonction cétone située, naturellement ou après modification chimique, en position 17 de certains précurseurs stéroïdiens tels que la DHEA, par exemple. Plus particulièrement, dans le cas du substrat DHEA, l'activité enzymatique de la protéine codée par le gène *yil124w* conduit à la réduction de la fonction cétone de ce stéroïde et à la formation d'un 3, 17-diol, auquel on référera ci-après comme « Diol ». En outre, lorsque le cas l'impose, la séquence du gène *yil124w* étant connue, il est aisé à l'homme du métier, familier des techniques de mutagenèse dans la levure, de produire une souche de levure dans lesquelles le gène *yil124w* est inactivé. Par exemple, conformément aux exemples qui suivent, il est possible d'obtenir des souches de levure pour lesquelles la séquence codante du gène *yil124w* est interrompue (technique Knock-out) et l'activité enzymatique supprimée.

Le gène *Cyp7b* est connu, il a déjà été décrit par Stapleton et al., (1995, J. Biol. Chem., 270, 29739-29745) ou Rose *et al.* (1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4925-4930). Sa séquence est notamment décrite dans la demande de brevet WO9612820 et est accessible auprès de Institute for Fermentation Osaka (IFO) sous le code d'accès IFO 2031. Les contenus de ces documents sont incorporés par référence à la présente demande. Toutefois, rien ne laissait supposer que ce gène de mammifère pouvait être exprimé, et plus particulièrement exprimé sous sa forme active, par une levure. En outre, rien ne permettait d'envisager qu'une telle levure serait capable d'utiliser un stéroïde comme substrat. En effet, le gène *Cyp7b* est un gène isolé chez les mammifères, notamment le rat, la souris et l'homme, chez lesquels l'enzyme codée par ce gène appartient à la famille des enzymes communément appelées « cytochromes



P450 », dont la forme active renferme de l'hème (Poulos, 1988, Pharm. Res., 5, 67-75) et qui sont impliquées dans les voies métaboliques des stéroïdes (voir Rose *et al.*, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4925-4930). La protéine Cyp7b est une hydroxylase, et plus particulièrement une 7-hydroxylase permettant d'obtenir des stéroïdes 7-hydroxylés, et plus particulièrement des stéroïdes 7 $\alpha$ -hydroxylés. Néanmoins, il est possible d'envisager le cas particulier pour lequel le substrat stéroïdien est un équivalent des composés stéroïdiens connus, dans lequel par modification de la structure de l'un des cycles la « position naturellement 7 » soit transformée en un « équivalent position 6 ». Dans ce cas précis, la protéine Cyp7b permettrait d'obtenir des stéroïdes 6-hydroxylés.

Selon un cas préféré de l'invention, l'action sur le composé « Diol » décrit plus haut de l'enzyme Cyp7b exprimée dans les levures utilisées permet la formation d'un 3, 7, 17- triol, ci-après dénommé « Triol ». En outre, lorsque la fonction 3OH dudit diol ou dudit triol est acétylée, on parlera respectivement d'« acétyl-diol » ou d'« acétyl-triol ».

La nature des stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés produits selon le procédé de l'invention dépend par conséquent de la possibilité pour la levure d'exprimer ou non les fonctions d'acétylation codée par le gène *atf2*, et/ou de déshydrogénation, codée par le gène *yil124w*, en combinaison avec la possibilité pour ladite levure d'exprimer l'enzyme d'hydroxylation Cyp7b.

De préférence, les composés que l'on souhaitera produire selon la présente invention seront des composés hydroxylés, dans la mesure où, pour un grand nombre de stéroïdes, il a été montré que le dérivé hydroxylé était plus actif que le dérivé acétylé. Néanmoins, à cet égard, il convient de noter que la fonction acétyle est susceptible d'être progressivement hydrolysée *in vivo* et peut donc constituer une forme retard de la forme hydroxylée (c'est à dire que le composé tel qu'administré au patient n'est pas la forme active mais que cette forme active est obtenue *in vivo*, après métabolisation naturelle du composé acétylé). C'est pourquoi la présente invention concerne tout aussi bien un procédé de production de stéroïdes comportant des fonctions OH libres, que protégées par un radical acétyle.

En tout état de cause, selon le mode de réalisation préféré pour lequel on cherche à produire des dérivés stéroïdiens hydroxylés, il est souhaitable que l'activité





APAT de la levure mise en œuvre dans le procédé de l'invention soit faible ou nulle. Pour ce faire, il existe différentes possibilités.

Selon une première variante, il est possible d'utiliser des souches de levures dans lesquelles le gène *atf2* est naturellement absent ou, à tout le moins, est peu ou non exprimé. Ainsi, Nagasawa et al. (Biosci. Biotechnol. Biochem. 62, 1852-1857, 1998) mentionnent qu'une souche IFO2031 (*Saccharomyces bayanus*) est exempte du gène *atf2*.

Selon une autre variante, il est possible d'utiliser des conditions de culture dans lesquelles la capacité des levures à acétyler le ou les précurseurs stéroïdiens présents dans le milieu de culture est fortement réduite, voire éliminée. En particulier, la demanderesse a mis en évidence le fait que les souches possédant l'activité *atf2*+ effectuent des réactions d'acétylation plus limitées en conditions oxydatives, notamment par croissance sur des sources de carbone non fermentescibles, telles que par exemple le glycérol ou l'acétate.

Selon une troisième variante, il est également possible d'utiliser des souches de levure présentant, naturellement ou après manipulation génétique, une activité désacétylase. Cette activité a été décrite comme agissant sur les esters d'alcools à chaîne courte (rEF). L'utilisation d'un tel système permettrait de désacétyler les produits obtenus par l'activité APAT.

Enfin, il est possible d'utiliser des souches *atf2*<sup>-</sup>, c'est-à-dire dans lesquelles le gène ne s'exprime pas ou dans lesquelles le produit de ce gène est inactif. Plus particulièrement, l'homme du métier est capable, par des expériences de routine, de préparer des souches de levure dépourvues de l'activité enzymatique APAT, telles que notamment celles décrites dans Cauet et al. (1999, Eur. J. Biochem., 261, 317-324) ou dans la demande de brevet français FR2774393 dont les contenus sont incorporés par référence dans la présente demande.

De même, il peut être intéressant de n'induire l'activité du gène *atf2* qu'à un certain moment du procédé de l'invention, par exemple séquentiellement à l'expression du gène *Cyp7b*. Ainsi, certains promoteurs ont été décrits chez la levure, qui ne sont actifs qu'en présence d'une stimulation extérieure (Guarente et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 7410-7414) ou lorsque les levures sont en phase stationnaire (Panaretou et al., 1992, Eur. J. Biochem., 206, 635-640). L'utilisation d'un gène *atf2*



placé sous contrôle d'un tel promoteur permet par conséquent de contrôler l'activité APAT chez la levure renfermant un tel gène recombiné.

De la même façon, la présence chez la levure utilisée dans le procédé de l'invention d'une activité endogène similaire à l'activité 17BDH des mammifères (codée par le gène *yil124w*) mène à la formation de composés réduits qui peuvent apporter une valeur ajoutée par rapport au produit non modifié. Inversement, il peut également être souhaitable de disposer de souches de levure ou des conditions de culture pour lesquelles l'activité du gène *yil124w* est réduite ou supprimée. Ainsi, il est possible de faire appel à des conditions de culture en milieu oxydatif ou à l'utilisation de souches de levures dans lesquelles le gène *yil124w* a été inactivé.

Bien entendu, selon des cas préférés de l'invention pour lesquels il est intéressant d'obtenir des composés réduits, il est possible de disposer de souches de levure capables de surexprimer le gène *yil124w* ou d'exprimer l'activité 17BDH à un moment privilégié de la bioconversion, par exemple par l'utilisation de souches pour lesquelles le gène *yil124w* est placé sous le contrôle d'un promoteur inductible tel que ceux décrits plus haut.

Il est bien entendu possible de modifier en outre la fonction acétyle obtenue après l'action de l'activité APAT lors du procédé de l'invention mettant en œuvre une souche de levure *atf2+*, par exemple en transformant ladite souche de levure afin qu'elle exprime en outre une activité enzymatique réagissant sur ce substrat. On peut ainsi obtenir des dérivés stéroïdiens méthylés, lorsque le gène en question code pour une enzyme à activité méthylase.

Parmi les substrats précurseurs de stéroïdes utilisables dans la présente invention, il faut citer les stéroïdes ou précurseurs de stéroïdes possédant une position 7- hydroxylable, c'est à dire accessible et susceptible d'être hydroxylée par une enzyme présentant une activité hydroxylase. Des exemples de telles positions hydroxylables consistent notamment en un carbone, un soufre, un azote.

Parmi les substrats précurseurs de stéroïdes utilisables dans la présente invention, il faut citer plus particulièrement les stéroïdes 3-hydroxylés et notamment les stéroïdes 3- $\beta$ -hydroxylés, ou possédant une fonction 3-céto.

Plus particulièrement, sans que cette liste ne soit limitative, dans cette invention on considèrera un précurseur sélectionné parmi le groupe consistant en les stéroïdes à structure de type androstanique, androsténique, prégénanique, prégénénique, cholanique,

-----

cholénique, cholestérique, ergostanique, ergosténique, testostéronique ou stigmamique, par exemple la DHEA, la testostérone, la pregnénolone, la prégnanolone, le 25-hydroxy-cholestérol, le 5- $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ -17 $\beta$ -diol, ou le 5- $\alpha$ -androstène-3 $\beta$ -17 $\beta$ -diol.

- 5 Bien entendu, ces composés peuvent également être obtenus sous forme acétylée. La fonction cétone 17 des précurseurs en possédant une peut aussi subir une réduction, comme cela a été décrit précédemment.

L'invention peut être mise en œuvre en utilisant des levures de différents genres qui peuvent être, sans que cette liste ne soit limitative, sélectionnés parmi  
10 *Candida*, *Yarrowia*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulopsis*, *Pichia*, *Hansenula*.

Une réalisation préférée de l'invention mettra en œuvre des levures du genre *Saccharomyces*, par exemple *S. cerevisiae*.

Les conditions dans lesquelles ces levures peuvent être cultivées sont connues  
15 de l'homme du métier, il suffit d'ajouter au milieu de culture un substrat précurseur des stéroïdes souhaités pour mettre en œuvre le procédé selon la présente invention.

Les exemples proposés ci-dessous montrent que certains milieux sont plus favorables que d'autres à la production de stéroïdes hydroxylés, il s'agit là d'un paramètre qui peut être aisément optimisé par l'homme du métier.

20 Parmi les milieux, il faut citer : YPD, YPG, YNBD et YNBG contenant notamment du glycérol et/ou du glucose (voir également Sherman, 1991, Methods Enzymol., 194, 3-21). De même, il est possible d'adapter la composition du milieu en cours de procédé ou de sélectionner le milieu en fonction du promoteur sélectionné pour diriger l'expression du gène *Cyp7b* (par exemple, le milieu minimum YNBD sera  
25 choisi dans le cas du promoteur CYC1 et le milieu riche YPG sera sélectionné dans le cas du promoteur TEF1).

Les conditions additionnelles de culture sont les conditions habituelles mais peuvent être optimisées.

Les quantités de précurseur ajoutées au milieu de culture dans le cadre du  
30 procédé de l'invention seront choisies de manière à obtenir une concentration dans le milieu de bioconversion comprise entre 10 et 200  $\mu\text{g/ml}$ , préférentiellement comprise entre 20 et 100  $\mu\text{g/ml}$ .



Les levures utilisées dans le cadre de l'invention sont des souches transformées de façon à exprimer le produit du gène *Cyp7b*. Cela signifie que lesdites souches ont été préalablement modifiées de façon à introduire le gène *Cyp7b* dans les levures et permettre son expression. Pour ce qui concerne la transformation des levures afin d'exprimer le gène *Cyp7b*, il est possible d'introduire ce gène soit dans le génome de la levure, soit de façon à ce qu'il ait une localisation extrachromosomale. A ces effets, on peut utiliser des systèmes de type plasmidique, circulaires ou linéaires. Parmi les plasmides comportant des origines de réplication de la levure, on peut citer les plasmides dérivés du plasmide 2 $\mu$  de *Saccharomyces*, lequel comportera de préférence comme marqueur de sélection, soit un marqueur de sélection de résistance aux antibiotiques, par exemple le gène G418R, soit au moins un marqueur d'auxotrophie tel que URA3, URA3d LEU2. De telles techniques de transformation sont bien décrites dans la littérature et ne présentent pas de difficulté particulière.

Pour ce qui concerne le gène *Cyp7b*, sa séquence nucléique (Institute for Fermentation Osaka (IFO), code d'accès IFO 2031 ou SEQ ID N01) peut être clonée sous le contrôle d'un promoteur de levure tel que CYC1 (Degryse *et al.* Yeast (1995), 11, pp. 629-640), TEF1 (Cotrelle *et al.*, 1985, J. Biol. Chem., 260, 3090-3096) ou TDH3 (Bitter and Egan, 1984, Gene, 32, 263-274) afin de permettre son expression dans les levures transformées.

Le procédé de l'invention comporte en outre une étape selon laquelle les stéroïdes produits sont isolés du milieu. Une telle étape ne constitue pas un élément crucial dudit procédé et peut mettre en œuvre différentes techniques généralement utilisées dans le domaine de la purification des stéroïdes (chromatographie, HPLC,...).

L'invention concerne, en outre, les nouveaux stéroïdes hydroxylés qui peuvent être ou qui sont obtenus par le procédé décrit précédemment ainsi que leur utilisation dans le cadre d'applications thérapeutique ou prophylactique, notamment à titre de neurostéroïdes, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal.

Elle concerne également des compositions, notamment pharmaceutiques, renfermant de tels nouveaux stéroïdes hydroxylés. Ces compositions pharmaceutiques renferment en outre un ou plusieurs support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Un tel support est préférentiellement isotonique, hypotonique ou faiblement hypertonique et présente une force ionique relativement faible, tel que par





exemple une solution de sucrose. Par ailleurs, un tel support peut renfermer tout solvant, ou liquide aqueux ou partiellement aqueux tel que de l'eau stérile non pyrogène. Le pH de la formulation est en outre ajusté et tamponné afin de répondre aux exigences d'utilisation *in vivo*. La formulation peut également inclure un diluant, un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique, de même que des agents de solubilisation, de stabilisation, de préservation. Pour une administration injectable, on préfère une formulation en solution aqueuse, non-aqueuse ou isotonique. Elle peut être présentée en dose unique ou en multidose sous forme liquide ou sèche (poudre, lyophilisât...) susceptible d'être reconstituée de manière extemporanée par un diluant approprié.

Les exemples ci-après permettront de comprendre les méthodes de construction des vecteurs et de transformation des levures mais il s'agit là, pour l'essentiel, de technologies qui sont déjà connues de l'homme du métier. Les vecteurs sont décrits dans Degryse *et al.* (Yeast (1995), 11, pp. 629-640).

Il est entendu que les résultats ci dessous ne sont donnés qu'à titre d'exemples. Ainsi, les taux obtenus, par exemple dans les manipulations de bioconversion, ne sont donnés qu'à titre indicatif, et ne représentent aucunement une revendication de la capacité maximale du système en conditions optimisées.

#### EXEMPLE 1 : Construction des vecteurs d'expression pour l'ADNc de *cyp7b*

L'ADNc de *cyp7b* est amplifié en utilisant l'oligo de séquence SEQ ID N° 1, en introduisant ainsi un site Sall (souligné) et une séquence de 4A avant le codon ATG et une seconde amorce de séquence SEQ ID N° 2 introduisant un site MluI après le codon stop.

Le premier produit de PCR est sous-cloné après une restriction Sall MluI dans le site Sall MluI du vecteur équivalent à pTG10164 ( Degryse *et al.*, Yeast (1995), 11, pp. 629-640 ). Ceci conduit à un vecteur pTG14010 contenant le gène *Cyp7b* sous contrôle du promoteur CYC1 (Degryse *et al.* Yeast (1995), 11, pp. 629-640) dans un environnement 2 $\mu$  et avec le gène G418R (neo).

Ensuite, le promoteur TEF1 (Cotrelle et al., 1985, J. Biol. Chem., 260, 3090-3096) est cloné par échange ClaI Sall, ce qui conduit au vecteur pTG14011, les plasmides correspondants sont décrits dans l'article de Yeast pré- cité.



Par la méthode de recombinaison déjà décrite dans l'article de Yeast, le bloc d'expression NotI contenant le promoteur CYC1 (respectivement, TEF1) a été introduit dans le plasmide basé sur le 2 micron pTG10042 (respectivement, pTG10092) contenant le gène URA3d pour donner le plasmide pTG14012 (respectivement, pTG14014). Le plasmide pTG14015 a été construit de la même façon que pTG14014, à partir de pTG10220, qui porte le gène URA3, comme gène de sélection.

Le gène URA3d a été choisi parce qu'il conduit à une sélection pour un très grand nombre de copies en milieu minimum. Le gène URA3 produit un nombre moyen de copies, et la pression de sélection est raisonnable en milieu minimum.

Les plasmides pTG14012, pTG14014 et pTG14015 ont été introduits par transformation dans la souche FY1679-28c, les transformants sélectionnés sur un milieu minimal approprié puis stockés.

On trouvera ci-après un résumé des vecteurs d'expression pour *cyp7b* :

<u>PLASMIDE</u>	<u>PROMOTEUR</u>	<u>MARQUEUR DE SELECTION</u>
pTG14011	TEF1	G418R
pTG14012	CYC1	URA3d
pTG14014	TEF1	URA3d
pTG14015	TEF1	URA3

Tous les vecteurs contiennent le réplicon d'E. coli et l'origine de réplication du plasmide 2 $\mu$  de levure.

Les levures utilisées sont :

FY1679-28c (Mata *ura3-52 trp1* – 63 *leu2* – 1 *his3*- 200 GAL *fen1*), un ségréquant Mata de FY1679.

TGY202 et TGY206 sont des dérivés TRP1 obtenus après transformation des souches, respectivement, FY1679-28c et TGY186.

Dans TGY156, une partie du gène *atf2* a été inactivée et remplacée par URA3. TGY186 est un dérivé de TGY156 dans lequel le gène URA3 au locus *atf2* a été remplacé par TEF1 : :PGK1 sous forme de bloc d'expression.



Les souches sont transformées en utilisant la procédure à l'acétate de lithium (Ito, et al., 1983, J. Bact. 153, 163-168) ou par électroporation (Nacken et al., 1994, Nucleic Acids Res, 22, 1509-10) et sélectionnées sur un milieu solide YNBG contenant les acides aminés appropriés.

5

#### EXEMPLE 2 : BIOCONVERSION

Les cellules sont mises en croissance sur un milieu solide YNBG supplémenté avec les acides aminés appropriés. Une préculture est effectuée pendant 24 heures à 28°C dans un milieu ayant la même composition que le milieu de culture à tester. Le milieu minimal (YNB et la source de carbone) est supplémenté avec 0,5% de casamino  
10 acides (en plus des nutriments nécessaires pour la souche).

Lorsque le milieu de croissance contient du glycérol (2%), le glucose est également présent à 0,1% pour faire démarrer la culture.

Un aliquote de la préculture est utilisé pour inoculer 10 ml de milieu de culture avec une densité optique à 600 nm de 0,1 et la DHEA est solubilisée dans un mélange  
15 tergitol/éthanol 50/50 à 10 mg/ml (ou ajoutée au moment indiqué). A différents intervalles de temps un aliquote de 500 µl du milieu de culture est pris et on extrait les stéroïdes afin de les doser.

On ajoute au milieu de culture 4 ml de dichlorométhane, le mélange est passé  
20 au vortex pendant 10 minutes et centrifugé durant 3 minutes à 3 000 tours/minute. La phase organique est séchée sous un flux d'azote à 50°C. On ajoute au résidu 500 µl de dichlorométhane, l'échantillon est passé au vortex rapidement puis séché comme précédemment. Le résidu est repris dans un mélange isopropanol/eau 90/10 et transféré dans des tubes à injection qui sont scellés. L'échantillon est analysé par HPLC contre  
25 des standards composés de DHEA, 7-hydroxy DHEA et acétyl DHEA. Quelques standards contiennent en plus la 5-androstène-3β-17β-diol.

Les différents milieux de culture qui ont été utilisés sont YPG, YNBD (glucose à 2%) et YNBG (glycérol à 2%, glucose à 0,1%).

Les résultats obtenus sont rassemblés dans les exemples ci-après ;

30

-----

EXEMPLE 3 : Mise en évidence d'une activité intrinsèque 17-déshydrogénase chez la levure

L'incubation de TGY202 et de l'acétyl-DHEA pendant 49 heures dans le YNBD a permis d'isoler l'acétyl-diol, indiquant une activité déshydrogénase chez la  
5 levure.

La caractérisation du produit obtenu a permis de déterminer que cette activité est similaire à celle de la 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase des mammifères (17BDH).

10 EXEMPLE 4 : Identification du gène *yil124w* codant pour l'activité 17BDH de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Le gène *yil124w* a été amplifié par PCR en utilisant les amorces de séquences SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 4 qui introduisent respectivement des sites de restriction Sall et MluI. Le produit de l'amplification après restriction par les enzymes Sall et  
15 MluI a été sous-cloné dans le vecteur de levure pTG10851 pour donner le vecteur pTG14491. le gène *yil124w* est ainsi sous le contrôle du promoteur de levure TEF1 et du terminateur de levure PGK1. L'origine de réplication est le 2-micron et le marqueur de sélection est le gène de résistance au G418.

Après transformation de TGY206 par pTG14491, on effectue une  
20 bioconversion pendant 24 heures dans le milieu YNBD, en utilisant la DHEA en tant que substrat. Les stéroïdes présents dans le milieu de culture sont analysés :

	DHEA	Diol
TGY206	62	13
TGY206-pTG14491	27	52

les valeurs sont exprimées en  $\mu\text{g/ml}$  du stéroïde extrait du milieu de culture

Ces résultats confirment l'activité 17BDH du gène *yil124w*, et montrent que sa  
25 surexpression permet de produire des dérivés stéroïdiens réduits.

EXEMPLE 5 : Génération d'un mutant Knock-Out pour le gène *yil124w*

Le plasmide pTG14491 a été restreint par PstI et NcoI (sites de restriction uniques dans la séquence codante de *yil124w*) et les bouts cohésifs ont été rendus  
30 francs par l'ADN polymérase de T4. Le gène URA3, est alors cloné dans ce plasmide,





afin que la séquence codante de *yil124w* soit interrompue par ce marqueur de sélection URA3. Le plasmide résultant pTG14584 contient le gène URA3 dans le même sens de traduction que le gène TIL124w. Après restriction de pTG14584 par Sall et MluI, le fragment libéré contenant *yil124w* interrompu par URA3 est introduit dans les souches TGY202 et TGY206, et les colonies recombinantes sont sélectionnées sur YNBD + LH, la sélection étant pour une prototrophie pour l'uracile. Sont ainsi obtenues respectivement les souches TGY279 et TGY282.

Les souches TGY206 et TGY282 sont incubées en présence de DHEA ou acétyl-DHEA dans le milieu YNBD pendant 24h et les produits obtenus sont mesurés.

Produits	DHEA	acétyl-DHEA	Diol	acétyl-diols
	Substrat DHEA			
TGY206	56	0	43	0
TGY282	86	0	0	0
	Substrat acétyl-DHEA			
TGY206	4	34	7	20
TGY282	16	46	0	0

Résultats exprimés en µg/ml extrait du milieu de culture.

Il apparaît donc clairement que la souche TGY282 n'est plus capable de réduire le DHEA ou l'acétyl-DHEA en resp. diol ou acétyl-diols. Ceci confirme l'inactivation du gène *yil124w*, ainsi que de sa fonction 17-déshydrogénase.

Par ailleurs, il est possible d'observer que la levure possède une activité intrinsèque de désacétylation de l'acétyl-DHEA en DHEA. Ainsi, l'identification du gène responsable et sa sur-expression par rapport à l'activité APAT permettra de produire des stéroïdes sans utiliser des mutants du gène *atf2*.

EXEMPLE 6 : Mise en œuvre du procédé selon la présente invention pour obtenir la 7-hydroxy-DHEA à partir de la DHEA, en utilisant la souche TGY202, transformée avec les plasmides d'expression de *cyp7b*.

La souche TGY202 transformée avec les plasmides pTG14012, pTG14014 ou pTG14015 est incubée en présence de DHEA (40µg/ml) dans un milieu YPG, pendant



48 heures, et la présence de 7-hydroxy-DHEA (7 $\alpha$ HO-DHEA) est évaluée dans le milieu.

Les résultats sont rassemblés au tableau ci-après :

<u>TGY202</u>	<u>7-HYDROXY DHEA</u>
pTG14012	4,2
pTG14014	6,4
pTG14015	3,1

5 La présence de 7 $\alpha$ HO-DHEA dans le milieu indique que le gène *cyp7b* est exprimé sous une forme active permettant la bioconversion de la DHEA en 7 $\alpha$ HO-DHEA par la levure. Ainsi, tout substrat potentiel de Cyp7b peut être hydroxylé *in vivo* par une souche de levure exprimant *cyp7b*.

Par ailleurs, ces résultats indiquent que le promoteur TEF1 est plus efficace que  
10 CYC1, et que le marqueur de sélection URA3d donne de meilleurs résultats que le marqueur URA3.

EXEMPLE 7 : Augmentation de la production de 7 $\alpha$ HO-DHEA par bioconversion, par la modulation des conditions de fermentation

15 TGY202-pTG14012 et TGY202-pTG14014 sont incubées dans les milieux YNBD et YNBG pendant 48 heures, en présence de DHEA (40 $\mu$ g/ml) ajoutée au milieu immédiatement après inoculation, ou après 8 heures d'incubation.



Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant (en % de produit accumulé).

	DHEA (40µg/ml) ajoutée à t 0			
Milieu	YNBD		YNBG	
	TGY202- pTG14012	TGY202- pTG14014	TGY202- pTG14012	TGY202- pTG14014
acétyl-DHEA	20,1	9,6	65,2	55,8
acétyl-diol				
acétyl-triol				
DHEA	0	0	5,7	1,1
Diol	0	2,9	0	0
7αHO-DHEA	52,3	35,6	25,1	37,2
Triol	27,5	51,9	4,0	5,4
	DHEA (40µg/ml) ajoutée à t 0 + 8 heures			
acétyl-DHEA	3,0	2,0	25,1	0
acétyl-diol				
acétyl-triol				
DHEA	0	0	17,3	3,4
Diol	1,5	0	7,4	0
7αHO-DHEA	40,6	53,1	36,9	81,5
Triol	54,9	44,9	13,3	15,1

On constate ainsi une influence du milieu de fermentation et du moment de l'apport du substrat DHEA pour la production sélective de 7αHO-DHEA, une inoculation tardive donnant en général de meilleurs résultats, et le milieu YNBG étant supérieur aux autres milieux .

EXEMPLE 8 : Production préférentielle de 7αHO-DHEA en l'absence de dérivés acétylés par l'utilisation de souches KO pour l'activité APAT

TGY206-pTG14014 est incubée dans du YNBD en présence de DHEA (100µg/ml) pendant 49 heures.



L'analyse des produits obtenus indique que l'on récupère 100% de 7 $\alpha$ HO-DHEA (91,7 $\mu$ g/ml).

Lorsque le milieu de culture est YNBG, on obtient un mélange de 7 $\alpha$ HO-DHEA (89%, 73,8 $\mu$ g/ml), Triol (6%, 5 $\mu$ g/ml) et DHEA (5,3%, 4,4 $\mu$ g/ml).

- 5 Ces observations indiquent qu'en l'absence d'activité APAT, on évite la production de dérivés acétylés. En revanche, la présence de l'activité intrinsèque 17BDH mène à une présence contaminante des Diol ou Triol.

#### EXEMPLE 9 : Production préférentielle du Triol

- 10 L'incubation de TGY206-pTG14014 en présence de Diol (100 $\mu$ g/ml) pendant 48 heures mène à la production de 26,4  $\mu$ g/ml Triol (36%) des produits finaux, 74% de Diol restant) dans le YNBG. L'utilisation de YNBD donne un taux de bioconversion de 100%.

- 15 Ces résultats montrent qu'en changeant le milieu de fermentation, on peut canaliser la production de métabolites à partir d'un substrat. En particulier, on peut aisément concevoir que la surexpression du gène *yil124w* permet une accumulation rapide et/ou complète de dérivés réduits. En couplant cette surexpression avec celle de *cyp7b*, on peut ainsi aboutir à une conversion quasi-totale en Triol, à partir de DHEA comme substrat de départ.

20

#### EXEMPLE 10 : Production préférentielle de l'acétyl-DHEA par l'utilisation d'une souche de levure KO pour l'activité 17BDH

- 25 Les souches TGY202 et TGY279 ont été incubées avec le DHEA pendant 24 heures dans le milieu de culture YPD, et les stéroïdes produits mesurés.

	DHEA	Ac-DHEA	Diol	Ac-Diol
TGY202	1	84	14	1
TGY279	3	96	0	1

Résultats exprimés en pourcentage du total des stéroïdes extraits du milieu de culture

Il apparaît clairement que la souche TGY279 transforme quasi totalement le DHEA en acétyl-DHEA, en l'absence de l'activité 17BDH.





EXEMPLE 11 : Production exclusive de 7 $\alpha$ HO-DHEA par l'utilisation de la souche TGY282. KO pour les activités APAT et 17BDH, et exprimant *cyp7b*

- 5 Les souches TGY279 et TGY282 sont transformées avec le plasmide pTG14011 et sélectionnées sur YPG + G418. L'incubation des souches transformées dans le milieu YPD pendant 24 heures, en utilisant le DHEA en tant que substrat, permet de mesurer les taux des stéroïdes produits par ces souches.

	DHEA	Ac-DHEA	Diol	Ac-Diol	7 $\alpha$ HO-DHEA
TGY279-pTG14011	3	49	1	0	47
TGY282-pTG14011	31	0	1	0	68

Résultats exprimés en pourcentage du total des stéroïdes extraits du milieu de culture

- 10 Bien que la bioconversion ne soit pas allée au bout dans cette expérience, on voit que la souche TGY282-pTG14011 produit exclusivement du 7 $\alpha$ HO-DHEA à partir du DHEA, alors qu'une souche contenant également l'activité APAT produit, non seulement du 7 $\alpha$ HO-DHEA, mais aussi de l'acétyl-DHEA.



### REVENDICATIONS

1) Procédé de production de stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés comprenant les étapes selon lesquelles :

- on cultive des levures sur un milieu comprenant au moins un précurseur de tels stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés, puis
- on isole les stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés du milieu après bioconversion,

ledit procédé étant caractérisé en ce que lesdites levures sont des levures transformées de façon à exprimer le produit du gène *Cyp7b*.

2) Procédé selon la revendication 1 de production de stéroïde hydroxylé, caractérisé en ce que lesdites levures ont une activité APAT faible ou nulle et/ou en ce que l'on cultive lesdites levures dans des conditions oxydatives.

3) Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit précurseur contient une position 7 susceptible d'être hydroxylée.

4) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit précurseur est un stéroïde 3-hydroxylé, de préférence 3 $\beta$ -hydroxylé, ou possédant une fonction 3-céto.

5) Procédé selon la revendication 1 à 4, caractérisé en ce que ledit précurseur est choisi parmi les stéroïdes à structure de type androstanique, androsténique, prégénanique, prégénénique, cholanique, cholénique, cholestérique, ergostanique, ergosténique, testostéronique ou stigmamique.

6) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le précurseur est choisi parmi le groupe consistant en la DHEA, la testostérone, la pregnénolone, la prégnanolone, le 25-hydroxy-cholestérol, le 5- $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ -17 $\beta$ -diol, et le 5- $\alpha$ -androstène-3 $\beta$ -17 $\beta$ -diol.

7) Procédé selon l'une des revendications 2 à 6, caractérisé en ce que l'activité APAT de la levure a été rendue faible ou nulle par inactivation du gène *atf2* ou par utilisation d'un mutant *atf2*<sup>-</sup>.

8) Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la levure porte également une activité déshydrogénase.

9) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'activité déshydrogénase est une 17-déshydrogénase qui conduit à un dérivé 17-hydroxylé.



10) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'activité 17-déshydrogénase est portée par le gène *yil124w*.

5 11) Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'activité 17-déshydrogénase de la levure a été rendue faible ou nulle, en particulier par inactivation du gène *yil124w* ou utilisation d'un mutant *yil124w*<sup>-</sup>.

12) Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la levure est du genre *Saccharomyces*.

10 13) Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le gène *Cyp7b* est sous le contrôle d'un promoteur levure choisi parmi CYC1, TEF1 et TDH3.

14) Stéroïde hydroxylé et/ou acétylé caractérisé en ce qu'il peut être obtenu par le procédé selon l'une des revendications 1 à 13.

15 15) Souche de levure possédant une activité 17-déshydrogénase nulle par inactivation du gène *yil124w*.

16) Souche de levure transformée avec un plasmide comprenant une cassette d'expression exprimant le gène *Cyp7b*.

17) Utilisation d'un stéroïde selon la revendication 14, pour la préparation d'un médicament pour le traitement de maladies du système nerveux central.



WO 01/25469

1

LISTE DE SEQUENCES

<110> TRANSGENE SA

<120> PROCEDE DE PREPARATION DE STEROIDES MODIFIES PAR  
FERMENTATION DE LEVURES

<130> D18217

<150> FR 99 12410

<151> 1999-10-05

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 35

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Amorce  
pour amplifier cyp7b

<400> 1

gatcgctcgac aaaaatgtct ggagccacga cccta

35

<210> 2

<211> 25

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Amorce  
pour amplifier cyp7b

<400> 2

gatcacgcgt tttcagcttc tccaa

25

<210> 3

<211> 36

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Amorce  
pour isoler le gene yll24w de saccharomyces  
cerevisiae

<400> 3

gactgtcgac aagtatgtcg gagttacagt cacaac

36

<210> 4

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Amorce





WO 01/25469

2

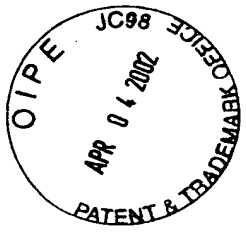
PCT/FR00/02753

pour isoler le gene yil124w de saccharomyces  
cerevisiae

<400> 4

ctacacgcgt ggtgtacaaa ctatacggaa

30



Handwritten text, possibly a signature or date, located in the upper right quadrant of the page.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
12 avril 2001 (12.04.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/25469 A3**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :

**C12N 15/53**, 15/54, 9/02,  
9/10, 1/19, C12P 33/06, C07J 75/00, A61K 31/56 // (C12P  
33/06, C12R 1:865) (C12N 1/19, C12R 1:865)

10, allée de la Toison d'Or, F-94000 Créteil (FR). **VICO, Pedro** [FR/FR]; Résidence le Colvert, 103, route de Schirmeck, F-67200 Strasbourg (FR). **LATHE, Richard** [GB/GB]; King's Buildings, West Mains Road, Edinburgh EH9 3JQ (GB).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR00/02753

(74) Mandataires : **MARTIN, Jean-Jacques** etc.; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

(22) Date de dépôt international : 4 octobre 2000 (04.10.2000)

(25) Langue de dépôt :

français

(81) États désignés (*national*) : AU, CA, JP, US.

(26) Langue de publication :

français

(84) États désignés (*régional*) : brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Données relatives à la priorité :

99/12410 5 octobre 1999 (05.10.1999) FR

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : **TRANS-GENE S.A.** [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR).

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 28 février 2002

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **CAUET, Gilles** [FR/FR]; 8, rue du Général Leclerc, F-67370 Griesheim sur Souffel (FR). **DEGRYSE, Eric** [BE/FR];

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

(54) Title: METHOD FOR PREPARING STEROIDS MODIFIED BY YEAST FERMENTATION

(54) Titre : PROCEDE DE PREPARATION DE STEROIDES MODIFIES PAR FERMENTATION DE LEVURES

(57) Abstract: The invention concerns a method for producing hydroxylated and/or acetylated steroid comprising steps which consist in: culturing yeasts on a medium comprising at least a precursor of such hydroxylated and/or acetylated steroids; then isolating the hydroxylated and/or acetylated steroids from the medium after bioconversion. Said method is characterised in that said yeasts are yeasts transformed so as to express the product of *Cyp7b* gene. The invention also concerns the modified yeast strains.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de production de stéroïde hydroxylé et/ou acétylé comprenant les étapes selon lesquelles: on cultive des levures sur un milieu comprenant au moins un précurseur de tels stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés, puis on isole les stéroïdes hydroxylés et/ou acétylés du milieu après bioconversion, ledit procédé étant caractérisé en ce que lesdites levures sont des levures transformées de façon à exprimer le produit du gène *Cyp7b*. L'invention concerne aussi les souches de levures modifiées.

WO 01/25469 A3



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No. [REDACTED]

PCT/FR 00/02753

#### A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7	C12N15/53	C12N15/54	C12N9/02	C12N9/10	C12N1/19
	C12P33/06	C07J75/00	A61K31/56	//(C12P33/06,C12R1:865),	
	(C12N1/19,C12R1:865)				

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

### B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P C07J A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

### C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 37664 A (ROSE KENNETH ANDREW ; SECKL JONATHAN ROBERT (GB); YAU JOYCE LAI WAH) 16 October 1997 (1997-10-16)	1,3-6, 12,14, 16,17
Y	page 10, line 25 -page 12, line 25 page 18, line 24-32 examples 1-4 claims 11-23,25-27,31-33 ---	2-7,13
Y	WO 99 40203 A (HOECHST MARION ROUSSEL INC) 12 August 1999 (1999-08-12) cited in the application page 1, line 1 -page 9, line 12 examples 1-6 claims 1,2,22-28 ---	2,7,13
	---	
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

**Y** Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

**"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone**

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

'&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 March 2001

Date of mailing of the international search report

12/04/2001

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van de Kamp, M

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/02753

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROSE K A ET AL.: "Cyp7b, a novel brain cytochrome P450, catalyzes the synthesis of neurosteroids 7.alpha.-hydroxy dehydroepiandrosterone and 7.alpha.-hydroxy pregnenolone" PROC. NAT'L. ACAD. SCI. USA, vol. 94, no. 10, 13 May 1997 (1997-05-13), pages 4925-4930, XP002163976	14,17
Y	abstract page 4925, right-hand column, line 36 -page 4926, left-hand column, line 4 table 1	3-6
A	--- WO 96 12810 A (UNIV EDINBURGH ;LATHE RICHARD (GB); ROSE KENNETH ANDREW (GB); STAP) 2 May 1996 (1996-05-02) page 9, line 10-14 page 21, paragraph 3.4.1 page 26, line 23 -page 27, line 6 claims 23-25	1,14,16
A	--- KOSHCHEYENKO K A ET AL.: "Immobilization of living microbial cells and their application for steroid transformations." ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, vol. 5, no. 1, 1983, pages 14-21, XP000990744 abstract; table 1 page 14, right-hand column, line 24 -page 15, left-hand column, line 2 page 17, right-hand column, line 16-25; figure 5	8-11,15
A	--- WARD O P ET AL.: "Reductive biotransformations of organic compounds by cells or enzymes of yeast;" ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, vol. 12, no. 7, 1990, pages 482-493, XP000990784 abstract page 483, left-hand column, line 3-29 page 489, left-hand column, line 41-54 page 491, left-hand column, line 29-31 page 491, left-hand column, line 58 -right-hand column, line 12 --- -/--	8-11,15

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/02753

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>IWASAKI M ET AL.: "Site-directed mutagenesis of mouse steroid 7-alpha-hydroxylase (cytochrome P-450-7alpha): Role of residue-209 in determining steroid-cytochrome P-450 interaction."</p> <p>BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 291, no. 2, 1993, pages 569-573, XP000990764</p> <p>abstract</p> <p>page 570, right-hand column, line 6-25</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,3-6, 12,14
A	<p>NAGATA K ET AL.: "Rat testosterone 7alpha-hydroxylase. Isolation, sequence, and expression of cDNA and its developmental regulation and induction by 3-methylcholanthrene."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 262, no. 6, 25 February 1987 (1987-02-25), pages 2787-2793, XP002163977</p> <p>abstract</p> <p>page 2791, left-hand column, line 1</p> <p>-right-hand column, line 14; figures 4,5</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,3-6, 12,14
P,X	<p>ATHENSTAEDT K ET AL.: "1-Acyldihydroxyacetone-phosphate reductase (Ayr1p) of the yeast Saccharomyces cerevisiae encoded by the open reading frame YIL124w is a major component of lipid particles"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 1, 7 January 2000 (2000-01-07), pages 235-240, XP002144501</p> <p>abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	15

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02753

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9737664 A	16-10-1997	AU 716503 B	24-02-2000
		AU 2302197 A	29-10-1997
		CA 2250874 A	16-10-1997
		EP 0954317 A	10-11-1999
		JP 2000511404 T	05-09-2000
		ZA 9703013 A	09-10-1998
WO 9940203 A	12-08-1999	FR 2774393 A	06-08-1999
		AU 2171499 A	23-08-1999
		BR 9904771 A	21-03-2000
		CN 1263558 T	16-08-2000
		EP 0977868 A	09-02-2000
		HR 990303 A	30-04-2000
		HU 0002858 A	28-12-2000
		PL 336301 A	19-06-2000
		SK 133199 A	16-05-2000
WO 9612810 A	02-05-1996	AU 711903 B	21-10-1999
		AU 3670395 A	15-05-1996
		CA 2203105 A	02-05-1996
		EP 0795017 A	17-09-1997
		JP 10512739 T	08-12-1998
		NZ 294019 A	28-05-1999
		US 5976850 A	02-11-1999



PCT/FR 00/02753

page 1 de 3

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Manuscrit internationale No  
PCT/FR 00/02753

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ROSE K A ET AL.: "Cyp7b, a novel brain cytochrome P450, catalyzes the synthesis of neurosteroids 7.alpha.-hydroxy dehydroepiandrosterone and 7.alpha.-hydroxy pregnenolone" PROC. NAT'L. ACAD. SCI. USA, vol. 94, no. 10, 13 mai 1997 (1997-05-13), pages 4925-4930, XP002163976	14,17
Y	abrégé page 4925, colonne de droite, ligne 36 -page 4926, colonne de gauche, ligne 4 tableau 1	3-6
A	--- WO 96 12810 A (UNIV EDINBURGH ;LATHE RICHARD (GB); ROSE KENNETH ANDREW (GB); STAP) 2 mai 1996 (1996-05-02) page 9, ligne 10-14 page 21, alinéa 3.4.1 page 26, ligne 23 -page 27, ligne 6 revendications 23-25	1,14,16
A	--- KOSHCHEYENKO K A ET AL.: "Immobilization of living microbial cells and their application for steroid transformations." ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, vol. 5, no. 1, 1983, pages 14-21, XP000990744 abrégé; tableau 1 page 14, colonne de droite, ligne 24 -page 15, colonne de gauche, ligne 2 page 17, colonne de droite, ligne 16-25; figure 5	8-11,15
A	--- WARD O P ET AL.: "Reductive biotransformations of organic compounds by cells or enzymes of yeast;" ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, vol. 12, no. 7, 1990, pages 482-493, XP000990784 abrégé page 483, colonne de gauche, ligne 3-29 page 489, colonne de gauche, ligne 41-54 page 491, colonne de gauche, ligne 29-31 page 491, colonne de gauche, ligne 58 -colonne de droite, ligne 12 --- -/--	8-11,15

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>IWASAKI M ET AL.: "Site-directed mutagenesis of mouse steroid 7-alpha-hydroxylase (cytochrome P-450-7alpha): Role of residue-209 in determining steroid-cytochrome P-450 interaction."            BIOCHEMICAL JOURNAL,            vol. 291, no. 2, 1993, pages 569-573,            XP000990764            abrégé            page 570, colonne de droite, ligne 6-25</p>	1,3-6, 12,14
A	<p>NAGATA K ET AL.: "Rat testosterone 7alpha-hydroxylase. Isolation, sequence, and expression of cDNA and its developmental regulation and induction by 3-methylcholanthrene."            JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,            vol. 262, no. 6,            25 février 1987 (1987-02-25), pages            2787-2793, XP002163977            abrégé            page 2791, colonne de gauche, ligne 1            -colonne de droite, ligne 14; figures 4,5</p>	1,3-6, 12,14
P,X	<p>ATHENSTAEDT K ET AL.:            "1-Acyldihydroxyacetone-phosphate reductase (Ayr1p) of the yeast Saccharomyces cerevisiae encoded by the open reading frame YIL124w is a major component of lipid particles"            JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,            vol. 275, no. 1,            7 janvier 2000 (2000-01-07), pages            235-240, XP002144501            abrégé</p>	15

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

International No  
PCT/FR 00/02753

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9737664 A	16-10-1997	AU 716503 B	24-02-2000
		AU 2302197 A	29-10-1997
		CA 2250874 A	16-10-1997
		EP 0954317 A	10-11-1999
		JP 2000511404 T	05-09-2000
		ZA 9703013 A	09-10-1998
WO 9940203 A	12-08-1999	FR 2774393 A	06-08-1999
		AU 2171499 A	23-08-1999
		BR 9904771 A	21-03-2000
		CN 1263558 T	16-08-2000
		EP 0977868 A	09-02-2000
		HR 990303 A	30-04-2000
		HU 0002858 A	28-12-2000
		PL 336301 A	19-06-2000
WO 9612810 A	02-05-1996	SK 133199 A	16-05-2000
		AU 711903 B	21-10-1999
		AU 3670395 A	15-05-1996
		CA 2203105 A	02-05-1996
		EP 0795017 A	17-09-1997
		JP 10512739 T	08-12-1998
		NZ 294019 A	28-05-1999
		US 5976850 A	02-11-1999